

**ИНДУКЦИЯ ПЕРЕКРЕСТНО-РЕАКТИВНЫХ АНТИТЕЛ У МЫШЕЙ,
ИММУНИЗИРОВАННЫХ КОНСЕРВАТИВНЫМИ ЛИНЕЙНЫМИ В-
КЛЕТОЧНЫМИ ЭПИТОПАМИ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА
ГРИППА А**

Сычев И.А.¹

Копейкин П.М.¹

Цветкова Е.В.^{1,2}

Чередова К.В.¹

Мильман Б.Л.¹

Шамова О.В.¹

Исакова-Сивак И.Н.¹

Дешева Ю.А.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины».

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет».

**INDUCTION OF CROSS-REACTIVE ANTIBODIES IN MICE
IMMUNIZED WITH CONSERVED LINEAR B-CELL EPITOPES
DERIVED FROM INFLUENZA A VIRUS NEURAMINIDASE**

Sychev I.A.^a

Kopeikin P.M.^a

Tsvetkova E.V.^{a,b}

Cheredova K.V.^a

Milman B.L.^a

Shamova O.V.^a

Isakova-Sivak I.N.^a

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ
CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

Desheva Y.A.^a

^a Federal State Budgetary Scientific Institution “Institute of Experimental Medicine”.

^b Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Saint-Petersburg State University”.

Резюме. Введение. Грипп является социально-значимой инфекцией, ежегодно наносящей значительный ущерб здоровью населения и экономике страны. Вакцинопрофилактика является наиболее эффективным способом борьбы с гриппом и его осложнениями. Существуют разнообразные вакцины против гриппа, однако, их общим недостатком является узкая специфичность, необходимость ежегодного обновления штаммового состава, не всегда удовлетворительная иммуногенность, а, следовательно, и эффективность. В этой связи пристальное внимание уделяется проблеме разработки универсальных гриппозных вакцин, направленных на индукцию перекрестно-реагирующих факторов иммунного ответа к наиболее консервативным участкам вирусных белков. Антитела против нейраминидазы (NA) способны обеспечивать гетеросубтипическую защиту, что важно ввиду потенциальной угрозы со стороны вирусов гриппа, с отличающимся гемагглютинином и нейраминидазой по сравнению с вирусами, которые циркулируют в настоящее время. Настоящее исследование посвящено поиску новых и анализу ранее предсказанных линейных В-клеточных эпитопов NA, консервативных среди всех подтипов вируса гриппа А.

Результаты. Было обнаружено 8 консервативных линейных В-клеточных эпитопов, расположенных вокруг активного центра нейраминидазы, три из которых (MNPNQKIIIGS, ILRTQESEC и DNWKGSNRP) были синтезированы *de novo*, конъюгированы с бычьим сывороточным альбумином и далее использовались для иммунизации мышей. С помощью иммуноферментного анализа в сыворотках иммунизированных мышей выявлялись специфические IgG антитела к различным вирусам гриппа А, содержащим NA подтипов N1, N2, N3 и N9. Иммунизация NA пептидами не защитила мышей от существенной потери веса после инфицирования летальным вирусом гриппа H1N1. Тем не менее, все иммунизированные мыши выжили в течение периода наблюдения, тогда как в контрольной

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ
CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

группе выживаемость составила только 28,6%. Анализ вирусной нагрузки в легких мышей, зараженных вирусом H1N1, не выявил различий в титрах ни на 4, ни на 8 сутки после заражения. В то же время, защитный эффект отсутствовал при заражении мышей летальным вирусом гриппа H7N9: уровень летальности, потеря веса и титры вируса в легких были сопоставимы у иммунизированных и контрольных мышей.

Заключение. Полученные в настоящем исследовании данные показали наличие кросс-реактивности у анти-NA антител, индуцируемых при иммунизации NA пептидами, а также защитной эффективности в отношении инфекции, вызванной вирусом H1N1, но не вирусом H7N9. Эти результаты указывают на перспективность использования линейных B-клеточных эпитопов NA для дизайна эпитоп-направленных гриппозных вакцин, но при этом требуется более глубокое и полное исследование специфичности консервативных эпитопов NA, а также оптимизация схем иммунизации для достижения более высоких показателей защитной эффективности.

Ключевые слова: вирус гриппа А, иммунный ответ, универсальная гриппозная вакцина, гетеросубтипический иммунный ответ, антинейраминидазные антитела, линейные B-клеточные эпитопы.

Summary. Introduction. Influenza is a socially considerable infection annually causing profound damage to the populational health and economy. Vaccination is the most effective way to manage influenza and its complications. There are various vaccines against influenza, but their common drawback is the narrow specificity, need for annual virus strain renewal, not always good immunogenicity and effectiveness. In this regard, a close attention is paid to developing universal influenza vaccines aimed to induce cross-reactive factors of the immune response to the most conserved parts of viral proteins. Antibodies against neuraminidase (NA) are able to provide heterosubtypic protection, which is important due to potential threat from influenza viruses, with differed

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ
CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

hemagglutinin and neuraminidase compared to the currently circulating viruses. The present study is aimed to search for new and analyze previously predicted linear NA B-cell epitopes, conserved among all subtypes of influenza A virus.

Results. there were found out eight conserved linear B-cell epitopes were located around the neuraminidase active site, three of which (MNPNQKIITIGS, ILRTQESEC, and DNWKGSNRP) were synthesized *de novo*, conjugated with bovine serum albumin to be further used for mouse immunization. Serum IgG antibodies were detected by ELISA in immunized mice. Antibodies specifically bind to various influenza A viruses containing NA subtypes N1, N2, N3, and N9. Immunization with NA peptides provided no protection from profound weight loss after infection with lethal H1N1 influenza virus. However, all immunized mice survived during the observation period, while in control group survival rate was as low as 28.6%. Assessing the viral load in the lungs of mice infected with the H1N1 virus did not reveal differences in titers either on day 4 or 8 post-infection. Nevertheless, the protective effect lacked upon challenge with lethal H7N9 influenza virus: mortality, weight loss, and lung virus titers were comparable both in immunized and control mice.

Conclusions. The data obtained uncovered cross-reactivity in anti-NA antibodies induced by immunization with NA peptides as well as protective efficacy against infection caused by the H1N1, but not H7N9 virus. Thus, these data are promising and indicate that linear B-cell NA epitopes can be used for design of epitope-directed influenza vaccines, but a deeper and full examination of specificity for conserved NA epitopes as well as optimized immunization schemes are necessary to achieve higher protective efficacy.

Key words: influenza A virus, immune response, universal influenza vaccine, heterosubtypic immune response, antineuraminidase antibodies, linear B-cell epitopes.

1 **Введение**

2 Основными антигенами вируса гриппа являются поверхностные
3 гликопротеины гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA). Антитела
4 против гемагглютинина являются нейтрализующими, т.е. препятствуют
5 проникновению вируса в клетку и развитию инфекционного процесса, тогда
6 как антинейраминидазные антитела не обладают нейтрализующей
7 активностью, но при этом способны обеспечивать гомологичную и
8 гетерологичную защиту, как было показано ещё в 70-х гг. [24, 33]. Кроме
9 того, антитела против нейраминидазы способны обеспечивать
10 гетеросубтипическую защиту [29], что особенно важно ввиду потенциальной
11 угрозы для людей со стороны вирусов гриппа птиц H5N1 и H7N9, которые
12 могут преодолевать межвидовой барьер и считаются возможными
13 возбудителями будущей пандемии гриппа [8]. Вклад анти-NA антител в
14 защиту против сезонных вирусов гриппа активно обсуждается в последние
15 годы в связи с острой необходимостью повышения эффективности сезонных
16 противогриппозных вакцин [16, 17, 22].

17 В настоящее время активная иммунопрофилактика гриппозной инфекции
18 осуществляется с помощью вакцинации населения [25]. Из-за высокой
19 изменчивости вирусов гриппа штаммовый состав гриппозных вакцин
20 необходимо обновлять практически ежегодно. В этой связи актуальной
21 задачей является усовершенствование существующих гриппозных вакцин с
22 целью расширения их спектра действия. В 2013 г.
23 Т. Дойл и соавт. [15] описали один из В-клеточных эпитопов в NA,
24 консервативный среди всех подтипов вируса гриппа А. Моноклональные
25 антитела, полученные против данного эпитопа, эффективно ингибировали *in*
26 *vitro* активность вирусов гриппа А всех подтипов NA, а также защищали
27 мышей против летальной инфекции. В данной работе мы расширили это
28 исследование, предсказав новые консервативные эпитопы NA вирусов

29 гриппа А и оценив иммуногенность и кросс-реактивность некоторых из них,
30 в качестве попытки разработать противогриппозную вакцину широкого
31 спектра действия.

32

33 **Материалы и методы**

34 *Вирусы.*

35 В работе использовали следующие эпидемические и реассортантные штаммы
36 вирусов гриппа А, полученные либо из Центра по контролю и профилактике
37 заболеваний (CDC, Атланта, США), либо из коллекции штаммов отдела
38 вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ»:

39 1) А/Южная Африка/3626/13 (H1N1pdm09);

40 2) А/17/кряква/Нидерланды/00/95 (H7N3) – реассортантный штамм,
41 унаследовавший гены НА и NA от вируса А/кряква/Нидерланды/12/2000
42 (H7N3), а остальные 6 генов – от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57
43 (H2N2) (Лен/17) [1];

44 3) А/Гонконг/17rg 6:2 PR8 (H7N9) – реассортантный штамм,
45 унаследовавший НА и NA гены от высокопатогенного вируса
46 А/Гонконг/125/2017 (H7N9), а остальные 6 генов – от модельного штамма
47 А/PR/8/34 (H1N1) (PR8). Ген НА был модифицирован путем удаления
48 четырех основных аминокислот из кливедж-сайта молекулы для обеспечения
49 низкопатогенного фенотипа;

50 4) А/Индонезия/5/2005 IBCDC-RG2 (H5N1) – реассортантный штамм,
51 унаследовавший модифицированный ген НА и интактный ген NA от
52 высокопатогенного штамма А/Индонезия/05/05 (H5N1), а остальные 6 генов
53 – от модельного штамма PR8;

54 5) RN1/09-свиной (H7N1) – реассортантный штамм, содержащий НА ген
55 от вируса А/лошадь/Прага/1/56 (H7N7), NA ген от штамма
56 А/Калифорния/07/2009 (H1N1)pdm09, а остальные 6 генов – от донора
57 аттенуации Лен/17 [3];

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ

CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

58 6) RN2/57-человек (H7N2) – реассортантный штамм, унаследовавший ген
59 NA от вируса А/лошадь/Прага/1/56 (H7N7), а остальные 7 генов – от донора
60 Лен/17 [2];

61 7) RN2/97-птичий (H7N2) – реассортантный штамм, унаследовавший ген
62 NA от вируса А/Ануи/1/2013 (H7N9), ген NA от штамма
63 А/перепел/Гонконг/G1/97 (H9N2), а остальные 6 генов – от донора
64 аттенуации Лен/17;

65 8) RN9/13-человек (H6N9) – реассортантный штамм, унаследовавший ген
66 NA от вируса А/серебристая чайка/Сарма/51с/06 (H6N1), ген NA от штамма
67 А/Ануи/1/2013 (H7N9), а остальные 6 генов – от донора аттенуации Лен/17
68 [5].

69 Вирусы накапливали в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) (ЗАО
70 «Птицефабрика Синявинская», Ленинградская обл.) при температуре 37°C
71 (для эпидемических вирусов и реассортантных штаммов на основе вируса
72 PR8) или 33°C (для реассортантных штаммов на основе донора Лен/17).
73 Инфекционный титр вирусов в РКЭ определяли методом предельных
74 разведений, для чего эмбрионы заражали 10-кратными разведениями вирусов
75 и инкубировали в течение 48 часов. Титр вируса рассчитывали по методу
76 Рида и Менча [30] и выражали в \log_{10} 50% эмбриональных инфекционных
77 доз (ЭИД₅₀)/мл. Очистку и концентрирование вирусов проводили путем
78 ультрацентрифугирования на 30%/60% градиенте сахарозы.

79

80

81 *Поиск линейных В-клеточных эпитопов нейраминидазы вирусов гриппа А.*

82 Для поиска консервативных эпитопов NA был отобран ряд аминокислотных
83 последовательностей нейраминидаз различных вирусов гриппа А (в
84 основном H1N1, H2N2, H3N2, H7N3 и H7N9), используя базу данных
85 вирусов гриппа Национального центра биотехнологической информации
86 (The Influenza Virus Resource at the National Center for Biotechnology

87 Information) [6]. Выравнивание последовательностей производилось при
88 помощи программы UGENE от UniPro (версия 1.31.0) [26]. Существующие
89 на данный момент алгоритмы предсказания не способны с большой
90 точностью и чувствительностью предсказывать линейные В-клеточные
91 эпитопы. Поэтому для достижения большей точности в данном исследовании
92 использовалось шесть методов с последующим обобщением полученных от
93 каждого из них результатов. Все они реализованы как веб-инструменты и
94 имеют свободный доступ. Мы использовали следующие методы: VeriPred
95 [23], ElliPro [28], ABCPred [32], EpiToPIA [31], AAPred [10, 12], COVEpro
96 [36].

97

98 *Пептидный синтез и подготовка антигена для иммунизации.*

99 Пептиды, соответствующие линейным В-клеточным эпитопам NA, были
100 химически синтезированы твердофазным методом (SPPS) [9]. Вкратце,
101 использовался твердый носитель – 2-хлортритильная смола («Iris Biotech»,
102 Германия). Последовательность пептидов наращивалась вручную. N-
103 концевая α -аминогруппа была защищена временной Fmoc-группой
104 (стратегия 9-флуоренилметилоксикарбонил (Fmoc)/ трет-бутил (tBu) («Iris
105 Biotech», Германия)). Активация α -аминогруппы *in situ* происходила с
106 использованием 1,3-диизопропилкарбодиимида («Iris Biotech», Германия) в
107 N,N-диметилформамиде («Вектон», Россия). Временную защиту Fmoc
108 удаляли с помощью основного 20% 4-метилпиперидина («Вектон», Россия),
109 растворенного в
110 N,N-диметилформамиде, и постоянную защиту трет-бутила и боковой цепи
111 трет-бутилоксикарбонила («Iris Biotech», Германия) с помощью
112 трифторуксусной кислоты («Sigma-Aldrich», США) и
113 H₂O/триизопропилсилан («Sigma-Aldrich», США)/1,2-этандитиол («Sigma-
114 Aldrich», США) во время отделения от твердой подложки. Очистку пептидов
115 осуществляли с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной

116 жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ), после чего образцы высушивали
 117 путем центрифугирования под вакуумом на установке SpeedVac (Savant,
 118 США). Чистота полученных пептидов составляла не менее 95%, что было
 119 подтверждено аналитическим электрофорезом, аналитической ОФ ВЭЖХ и
 120 масс-спектрометрическим анализом (МАЛДИ; кроме того, подтверждение
 121 идентичности). Масс-спектры пептидов регистрировали на приборе
 122 Ultraflexxtreme (Bruker, Германия) в стандартных условиях: положительные
 123 ионы, рефлексный режим, матрица - 4-гидрокси- α -цианокоричная кислота.
 124 Концентрацию пептидов в полученных образцах определяли
 125 спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность растворов при длине
 126 волны 280 нм (если в состав пептида входили остатки тирозина или
 127 триптофана) или при длине волны 214 нм (если в составе молекулы пептида
 128 отсутствовали остатки данных ароматических аминокислот), а затем
 129 рассчитывая их концентрацию с помощью вычисленных на основе
 130 аминокислотного состава пептидов коэффициентов молярной экстинкции
 131 [27].

132 Пептиды конъюгировали с бычьим сывороточным альбумином (БСА)
 133 («Sigma-Aldrich», США) для дальнейшей иммунизации экспериментальных
 134 животных. Был использован глутаровый альдегид (ООО «БИО», Россия) в
 135 качестве конъюгирующего реагента. Чтобы конъюгация с применением
 136 данной методики была возможна, в состав аминокислотной
 137 последовательности каждого пептида включали остаток лизина на С-конце
 138 молекулы. Для получения конъюгата к 1 мг пептида добавляли 0,5 мл 0,1 М
 139 натрий-фосфатного буфера (НФБ), рН 7,0. К полученному раствору
 140 добавляли 5 мг БСА, предварительно разведенного в 0,5 мл 0,1 М НФБ. К
 141 полученной смеси добавляли 1 мл свежеприготовленного 0,02% глутарового
 142 альдегида в 0,1 М НФБ. Инкубировали 1 ч при комнатной температуре, затем
 143 проводили диализ против деионизированной воды в течение 24 ч при 4°C.
 144 Концентрацию белка в конъюгате определяли по методу Брэдфорда [7].

145 Образование конъюгатов контролировали методом масс-спектрометрии
 146 МАЛДИ, используя линейный режим масс-анализа. Пример показан на
 147 рисунке 1.

148

149 *Оценка иммуногенности и защитной эффективности НА пептидов для*
 150 *мышей.*

151 Экспериментальная работа с животными проводилась в согласно «Правилам
 152 проведения работ с использованием экспериментальных животных» [4] и
 153 была одобрена локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол
 154 №3/17 от 30.11.2017). В работе использовались самки мышей линии СВА
 155 (питомник «Рапполово», Ленинградская область), по 14 животных в группе.
 156 Мышей иммунизировали интраперитонеально смесью из трех пептидов
 157 (MNPNQKIIIGS, ILRTQESEC и DNWKGSNRP), конъюгированных с БСА,
 158 в концентрации 15 мкг/мл трехкратно с интервалом 2 недели. Для усиления
 159 иммуногенности смеси применялся неполный адъювант Фрейнда («Sigma-
 160 Aldrich», США) в соотношении 2:1. Контрольным мышам вводили
 161 стерильный фосфатно-солевой буфер (PBS, ООО «Биолот»). Забор крови у
 162 иммунизированных мышей проводили через 2 недели после третьей
 163 иммунизации, после чего животных делили на 2 группы и заражали
 164 интраназально вирулентными вирусами А/Южная Африка/3626/13
 165 (H1N1pdm09) или А/Гонконг/17rg 6:2 PR8 (H7N9), взятыми в дозе 1 LD₅₀
 166 (50%-ная летальная доза), в объеме 50 мкл. Выживаемость и потерю веса у
 167 зараженных мышей оценивали ежедневно в течение 10 дней. Забор легких у
 168 мышей производили на 4-й и 8-й день после заражения и хранили
 169 замороженными при -70°C. Гомогенаты тканей легких готовили с
 170 использованием гомогенизатора TissueLyser LT («QIAGEN», Германия) в 1
 171 мл стерильного PBS, содержащего антибиотик-антимикотик («Invitrogen»,
 172 Великобритания). Гомогенаты осветляли низкоскоростным
 173 центрифугированием при 6000 об/мин в течение 5 мин. Полученные

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ
CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

174 супернатанты использовали для определения титров вирусов в РКЭ по
175 описанной выше схеме.

176 Иммуногенность NA пептидов оценивали по содержанию вирус-
177 специфических IgG антител в сыворотках крови иммунизированных мышей.
178 Для разрушения термолабильных ингибиторов гемагглютинации сыворотки
179 прогревались при 56°C в течение 30 мин. Для удаления NA-чувствительных
180 ингибиторов гемагглютинации один объем цельной сыворотки
181 инкубировался 18-20 ч при 37°C в присутствии 3 объемов экстракта
182 нейраминидазы холерных вибрионов (RDE, Denka Seiken CO., LTD, Япония),
183 с последующей инактивацией фермента прогреванием проб при 56°C в
184 течение 1 ч. После этого к пробам добавляли 6 объемов стерильного PBS (т.е.
185 разведение исходной сыворотки 1:10).

186 Постановка иммуноферментного анализа (ИФА) проводилась согласно
187 опубликованной ранее методике [13], с некоторыми изменениями. Планшеты
188 («Sarstedt», Германия) покрывали различными вирусами гриппа А,
189 разведенными в PBS до 20 агглютинирующих единиц (АЕ). В качестве
190 блокирующего буфера использовали 1% овальбумин. Использовались козы
191 анти-мышинные IgG антитела («Sigma-Aldrich», США), меченые пероксидазой
192 хрена, в разведении 1/20000. Проявление пероксидазной реакции
193 проводилось с добавлением 100 мкл ТМВ субстрата («BD Biosciences»,
194 США). Ферментативную реакцию останавливали 100 мкл 1 Н серной
195 кислоты, после чего оптическую плотность считывали на спектрофотометре
196 при длине волны 450 нм. За титр сыворотки принимали наивысшее
197 разведение образца, дающее оптическую плотность при длине волны 450 нм,
198 превышающую среднюю оптическую плотность в контрольных образцах
199 более чем на 3 стандартных отклонения.

200

201 *Статистическая обработка результатов.*

202 Анализ данных проводили с использованием программ Statistica 10 и
 203 GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc). Статистическую значимость
 204 различий между группами иммунизированных и контрольных мышей
 205 определяли либо при помощи непараметрического критерия Краскела-
 206 Уоллиса (титры антител в сыворотках крови и титры вирусов в легких
 207 мышей), либо при помощи критерия Мантела-Кокса (выживаемость мышей
 208 после заражения). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

209

210 **Результаты**

211 *Консервативные линейные В-клеточные эпитопы.*

212 Используя методы по предсказанию В-клеточных эпитопов и
 213 проанализировав последовательности нейраминидаз различных вирусов
 214 гриппа А, мы обнаружили 8 консервативных линейных В-клеточных
 215 эпитопов, расположенных вокруг активного центра нейраминидазы (рис.2):

- 216 1) MNPNQKI (1-7)
- 217 2) MNPNQKIITIGS (1-12)
- 218 3) ILRTQESEC (222-230)
- 219 4) DNWKGSNRP (293-301)
- 220 5) SGYSG (404-408)
- 221 6) SWPDG (457-461)
- 222 7) EECSCYP (276-282)
- 223 8) VELIRGR (424-430)

224 В скобках указан порядковый номер аминокислот по нумерации N2.

225 Для последующей работы были выбраны 3 эпитопа – MNPNQKIITIGS,
 226 ILRTQESEC и DNWKGSNRP. Они были синтезированы *de novo*,
 227 конъюгированы с БСА и далее использовались для иммунизации мышей.

228

229 *Иммуногенность NA пептидов.*

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ
CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

230 Титр сывороточных IgG антител определяли против ряда различных цельных
231 вирусов гриппа, представляющих различные подтипы NA (N1, N2, N3 и N9).
232 Было показано, что антитела из сывороток крови СВА мышей,
233 иммунизированных смесью трех пептидов, были способны реагировать с
234 различными антигенами (рис. 3). Так, среднегеометрические титры антител
235 (СГТ) были достоверно выше у вакцинированных мышей по сравнению с
236 животными контрольной группы для всех исследованных вирусов гриппа.

237

238 *Защитная эффективность NA пептидов.*

239 Для определения способности NA-специфичных антител обеспечивать
240 защиту против различных подтипов вируса гриппа А, иммунизированные
241 мыши были заражены двумя вирулентными вирусами гриппа: H1N1 и H7N9.
242 Несмотря на то, что иммунизация NA пептидами не защитила мышей от
243 существенной потери веса после инфицирования вирусом H1N1, все
244 иммунизированные мыши выжили в течение периода наблюдения, тогда как
245 в контрольной группе выживаемость составила только 28,6% ($p=0,013$) (рис.
246 4А, В). Анализ вирусной нагрузки в легких мышей, зараженных вирусом
247 H1N1, не выявил различий в титрах ни на 4, ни на 8 сутки после заражения
248 ($p>0,05$), однако в группе иммунизированных мышей у трех из пяти
249 животных вирус полностью элиминировался к 8 суткам, тогда как в
250 контрольной группе вирус продолжал размножаться у 100% мышей на 8 день
251 после заражения (рис. 4С).

252 В отличие от инфекции, вызванной вирусом H1N1, иммунизация смесью NA
253 пептидов не защитила мышей от заражения летальным вирусом H7N9:
254 уровень летальности, потеря веса и титры вируса в легких были сопоставимы
255 у иммунизированных и контрольных мышей ($p>0,05$) (рис. 4А-С). Эти
256 данные указывают на то, уровни анти-N9 антител, индуцированные
257 иммунизацией смесью исследуемых NA пептидов, являются недостаточными

258 для защиты мышей от клинических проявлений инфекции, вызванной
259 вирусом H7N9.

260

261 **Обсуждение**

262 На сегодняшний день основным способом борьбы с гриппом является
263 активная иммунопрофилактика населения с помощью специфических
264 вакцин. Необходимость того, что все гриппозные вакцины, как живые, так и
265 инактивированные, должны оцениваться на соответствие и эффективность по
266 двум антигенам – гемагглютнину и нейраминидазе, обсуждалась ещё в
267 1970-х гг. [14]. Несмотря на это, до сих пор все инактивированные вакцины
268 стандартизируются по содержанию НА, а количество НА в вакцине
269 различается у разных производителей [11, 19]. Однако основной проблемой
270 современных вакцин против гриппа является высокая степень антигенной
271 изменчивости НА, что приводит к необходимости актуализировать
272 вакцинный штамм практически ежегодно. В отличие от НА, NA подвергается
273 гораздо более медленному антигенному дрейфу, а некоторые
274 консервативные участки NA почти не изменяются в процессе эволюции [37].
275 В этой связи NA рассматривается как перспективный антиген для разработки
276 гриппозных вакцин широкого спектра действия [22]. С одной стороны,
277 улучшить эффективность вакцинации можно за счет регламентирования
278 минимального содержания NA в противогриппозных вакцинах [17, 11]. С
279 другой стороны, консервативные эпитопы NA можно использовать при
280 конструировании универсальной гриппозной вакцины [18, 20], а также как
281 дополнительный компонент к уже имеющимся вакцинам [34, 38]. В
282 последние годы ведется активная работа по поиску моноклональных антител
283 к ферментативному сайту NA, обладающих широкой кросс-реактивностью в
284 отношении вирусов гриппа А различных подтипов, а также вирусов гриппа
285 типа В [35]. Однако в подавляющем большинстве случаев эпитопы для таких

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ
CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

286 антител являются пространственными, т.е. составляющие его аминокислоты
287 расположены в различных участках белка, и только в результате его
288 фолдинга оказываются пространственно сближены. Очевидно, что такие
289 эпитопы не могут быть использованы для конструирования универсальных
290 гриппозных вакцин на имеющихся вакцинных платформах. В этой связи в
291 настоящем исследовании мы сконцентрировались на поиске линейных В-
292 клеточных эпитопов NA, консервативных среди различных вирусов гриппа
293 А.

294 В 2013 г. Т. Дойл с соавт. [15] определил один из линейных
295 В-клеточных эпитопов NA, консервативный для всех подтипов вируса
296 гриппа А, иммунизация которым давала защиту от вирусов гриппа со всеми
297 подтипами NA *in vitro* и частичную защиту *in vivo*. В нашем исследовании,
298 используя методы биоинформатики, было выявлено наличие 8
299 консервативных линейных В-клеточных эпитопов, расположенных вокруг
300 активного центра NA. Локализация выявленных эпитопов вблизи активного
301 центра NA вирусов гриппа различных подтипов говорит о том, что эти
302 участки NA являются функционально-значимыми и могут рассматриваться
303 как перспективные мишени для создания гриппозных вакцин широкого
304 спектра действия. На начальном этапе для пептидного синтеза и
305 последующей иммунизации мышей были выбраны три выявленных эпитопа
306 NA: MNPNQKIIITIGS [19], ILRTQESEC [15] и DNWKGSNRP [21]. Мы
307 использовали их в качестве смеси для иммунизации экспериментальных
308 животных, чего до настоящего времени никто не делал ранее. Смесь трех
309 пептидов, соответствующих отобраным эпитопам NA, при
310 внутрибрюшинном введении вызывала образование у мышей сывороточных
311 антител, связывающихся с цельными вирусами гриппа различных подтипов
312 NA (N1, N2, N3 и N9), что указывает на иммуногенность и кросс-
313 реактивность NA пептидов. Полученные в настоящем исследовании данные
314 показали способность индуцированных анти-NA антител защищать мышей

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ
CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

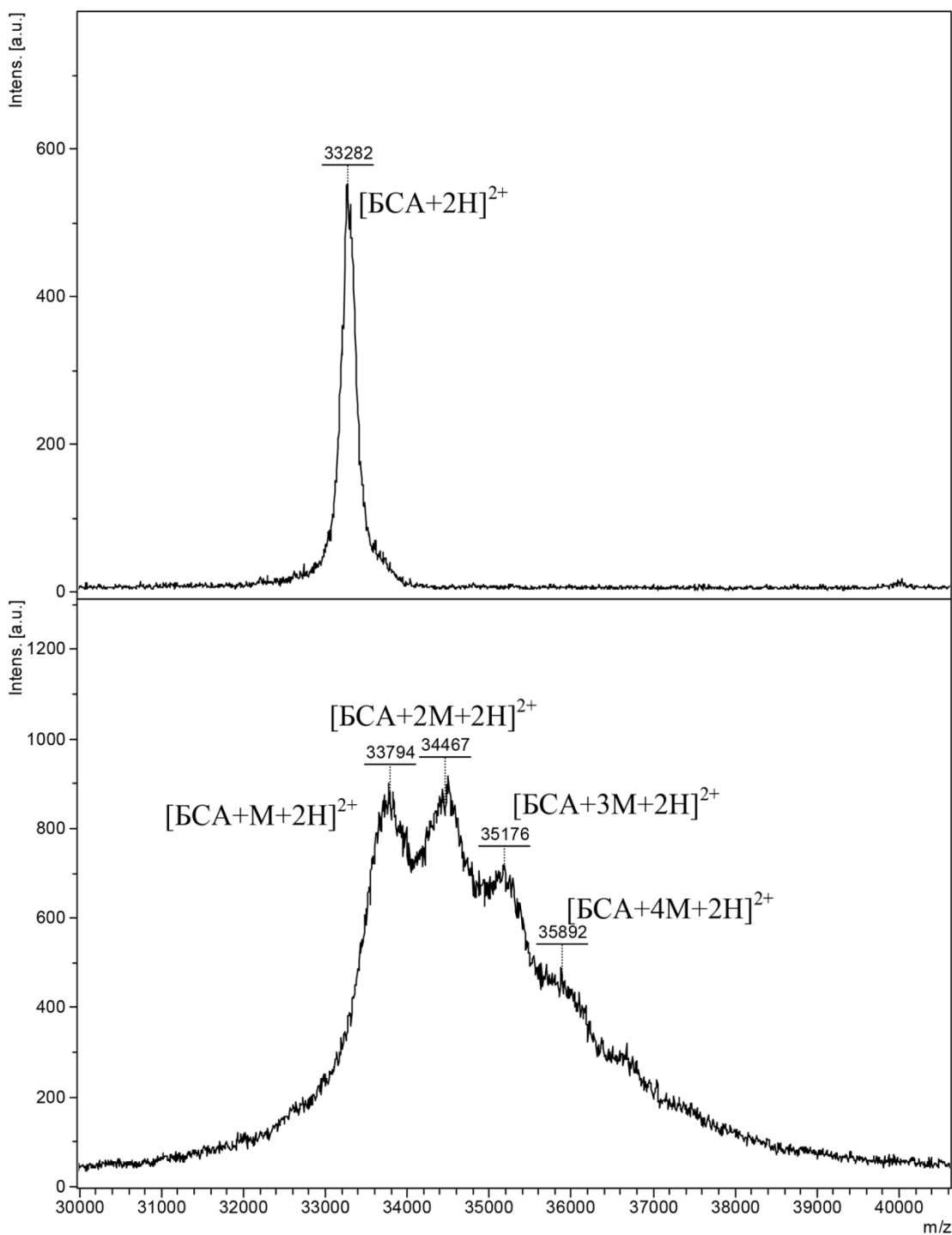
315 от летальности, вызванной вирусом H1N1, но при этом животные не были
316 защищены от смертности, вызванной вирусом H7N9. Эти результаты, с
317 одной стороны, показали перспективность использования линейных В-
318 клеточных эпитопов NA для дизайна эпитоп-направленных гриппозных
319 вакцин нового поколения, так, в частности, можно использовать живую
320 гриппозную вакцину в качестве вектора, где линейные эпитопы NA могут
321 быть встроены в молекулу гемагглютинина, что существенно повысит их
322 содержание в вирионе и, как следствие, повысит их иммуногенность. С
323 другой стороны, полученные данные указывают на необходимость более
324 глубокого и полного исследования специфичности консервативных эпитопов
325 NA, а также оптимизации схем иммунизации для достижения более высоких
326 показателей защитной эффективности, что будет сделано в будущем.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Масс-спектры БСА (молекулярная масса - 66431 Да, верхний масс-спектр) и его конъюгатов с пептидом MNPNQKIIITIGS (M, моноизотопная молекулярная масса 1314,7 Да, нижний масс-спектр). Показан участок спектра, содержащий сигналы двухзарядных ионов, в том числе ионов конъюгатов БСА с одной или несколькими молекулами. Точность измерения масс в этой области спектра составляет ± 100 -200 Да.

Figure 1. Mass spectrometry of BSA (molecular weight 66431 Da, upper mass spectrum) and its conjugates with the peptide MNPNQKIIITIGS (M, monoisotopic molecular weight 1314.7 Da, lower mass spectrum). A spectral section containing signals of doubly charged ions, including ions of BSA conjugates with one or more molecules, is shown. The accuracy of mass measurements in this region of the spectrum is ± 100 -200 Da.

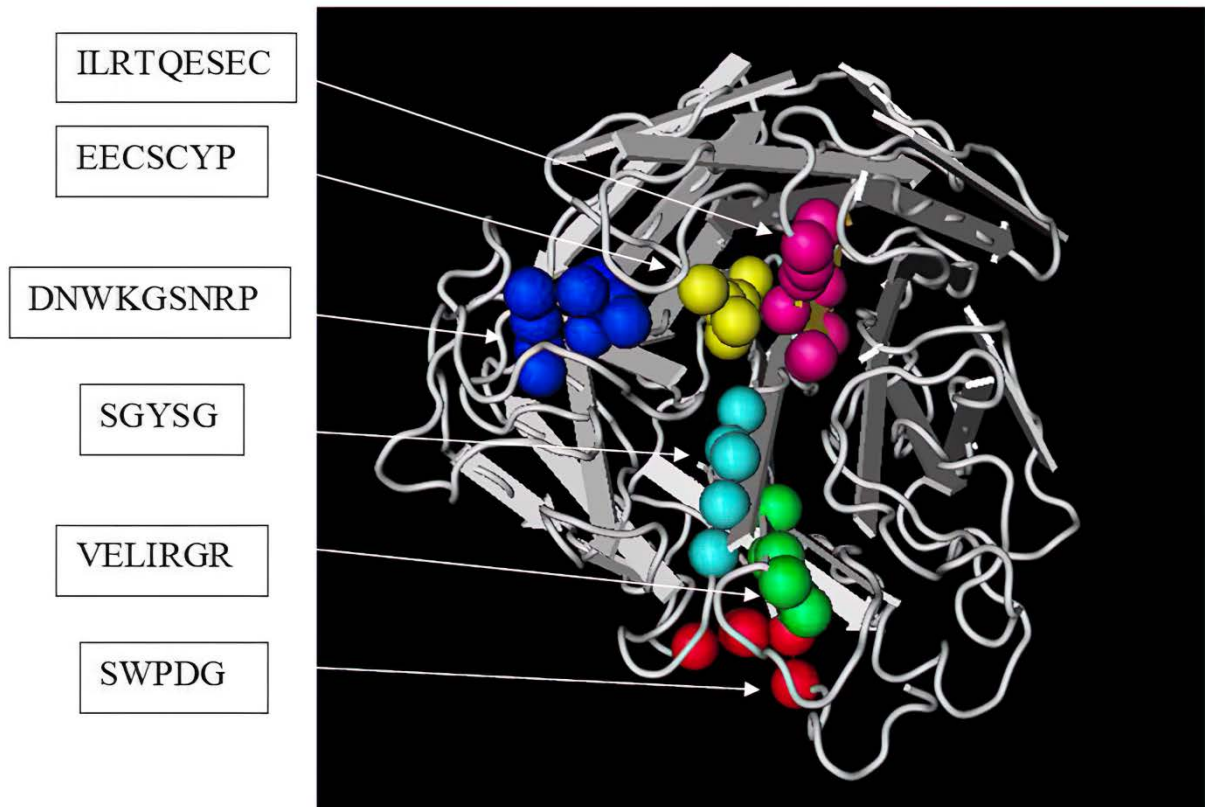
КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ
CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES



КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ
CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

Рисунок 2. Визуализация пространственного расположения обнаруженных консервативных линейных В-клеточных эпитопов на мономере молекулы НА. Эпитопы расположены вокруг активного центра.

Figure 2. Localization of discovered conservative linear B-cell epitopes on the monomer of the NA molecule. Epitopes are located around the active site.



КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ
CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

Рисунок 3. Иммуногенность смеси из трех NA пептидов при иммунизации мышей линии СВА. Указаны цельновирионные антигены, использованные в ИФА, и содержащие N1 (А, В), N2 (С, D), N3 (Е) и N9 (F) подтипы нейраминидазы. Указаны индивидуальные значения титров сывороток иммунизированных и контрольных мышей, а также среднегеометрические титры с 95% интервалом.

Figure 3. Immunogenicity of a mixture of three NA peptides for CBA mice. Whole virus ELISA antigens containing N1 (A, B), N2 (C, D), N3 (E) and N9 (F) neuraminidase subtypes are indicated. The individual titers of the sera of immunized and control mice are indicated, as well as the geometric mean titers with a 95% interval.

RN1/09-свиной (H7N1)

RN1/09-swine (H7N1)

Титры IgG антител в ИФА, \log_2

Titers of IgG antibodies by ELISA, \log_2

NA пептиды

NA peptides

Контроль

Mock

A/Индонезия/5/2005 IBCDC-RG2 (H5N1)

A/Indonesia/5/2005 IBCDC-RG2 (H5N1)

RN2/57-человек (H7N2)

RN2/57-human (H7N2)

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ
CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

RN2/97-птичий (H7N2)

RN2/97-avian (H7N2)

A/17/кряква/Нидерланды/00/95 (H7N3)

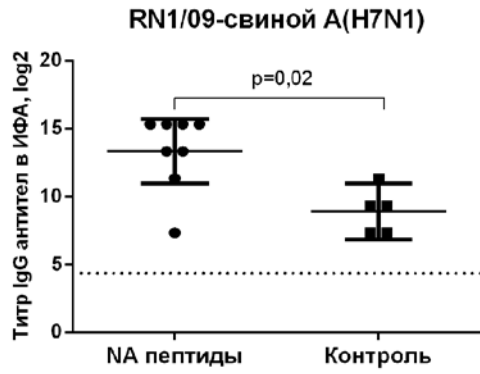
A/17/mallard/Netherlands/00/95 (H7N3)

RN9/13-человек (H6N9)

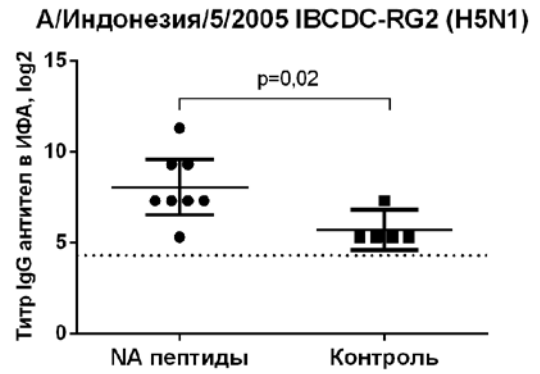
RN9/13-human (H6N9)

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ
CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

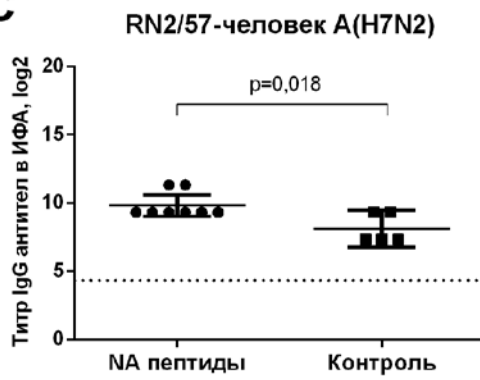
A



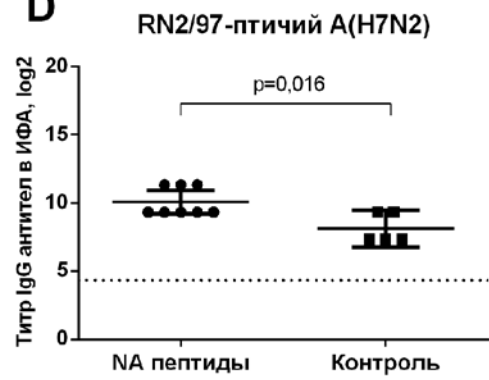
B



C



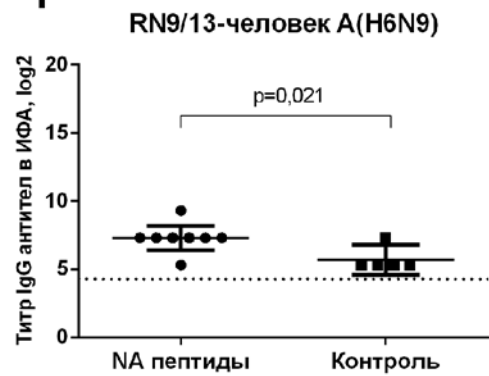
D



E



F



КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ
CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

Рисунок 4. Защитная эффективность смеси из трех NA пептидов при иммунизации мышей линии СВА. Оценку защитного эффекта вакцинации проводили по анализу потери веса животных (А), выживаемости (В) и титрам вирусов в легких мышей на 4 и 8 сутки после заражения (С). Пунктирная линия указывает на уровень детекции вируса в гомогенатах тканей легких мышей.

Figure 4. Protective efficacy of a mixture of three NA peptides for CBA mice. The protective effect of vaccination was assessed by monitoring animal weight loss (A), survival rates (B), and virus titers in the lungs of mice on days 4 and 8 after challenge (C). The dashed line indicates the limit of virus detection in the lung homogenates.

A/Южная Африка/3626/13 (H1N1pdm09)

A/South Africa/3626/13 (H1N1pdm09)

День после заражения

Day post challenge

Масса тела, %

Body weight, %

NA пептиды

NA peptides

Контроль

Mock

A/Гонконг/17rg 6:2 PR8 (H7N9)

A/Honk Kong/17rg 6:2 PR8 (H7N9)

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ
CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

Выживаемость, %

Survival, %

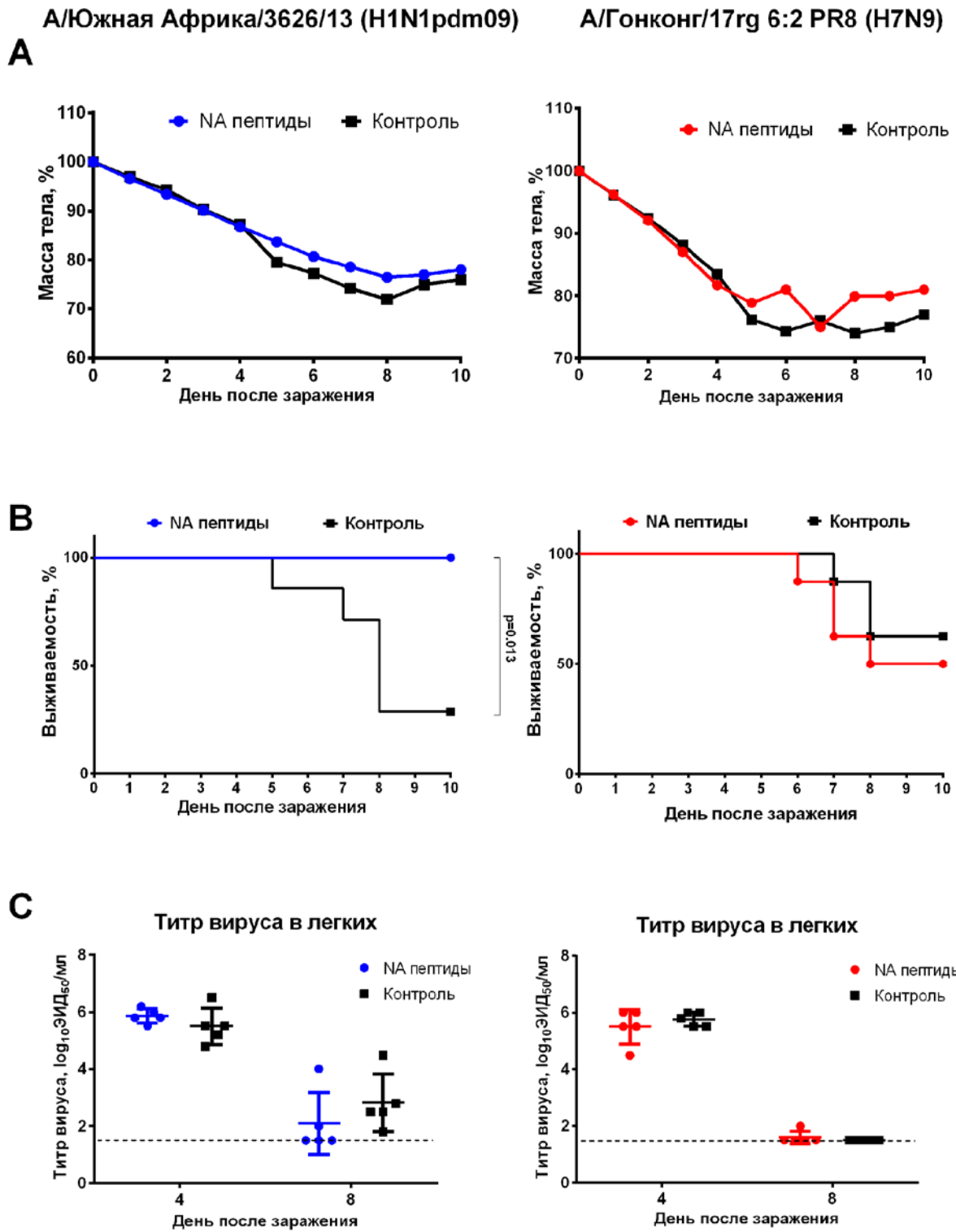
Титр вируса в легких

Virus titer in the lungs

Титр вируса, \log_{10} ЭИД₅₀/мл

Virus titer, \log_{10} EID₅₀/ml

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ
 CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES



МЕТАДАННЫЕ

Индукция перекрестно-реактивных антител у мышей, иммунизированных консервативными линейными В-клеточными эпитопами нейраминидазы вируса гриппа А.

18 страниц текста, включая титульный лист и резюме. 4 рисунка.

Раздел: оригинальная статья.

Дата отправления: 12.12.19

Адрес для переписки:

Сычев Иван Александрович

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины»

197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12.

Тел.: +7 (904) 638-04-18.

E-mail: sychev.ia@iemspsb.ru

Address for correspondence:

Sychev Ivan

Federal State Budgetary Scientific Institution “Institute of Experimental Medicine”

197376, Russian Federation, St. Petersburg, Pavlov str., 12.

Phone: +7 (904) 638-04-18.

E-mail: sychev.ia@iemspsb.ru

Авторы:

Сычев И.А. – младший научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Sychev I.A. – MD, Junior Researcher, Department of Virology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ
CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

Копейкин П.М. – младший научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Kopeikin P.M. – Junior Researcher, Department of General Pathology and Pathophysiology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Цветкова Е.В. – к.б.н., доцент, кафедра биохимии, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия.

Старший научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Tsvetkova E.V. – PhD, Associate Professor, The Department of biochemistry, FSBEI HE “Saint-Petersburg State University”, St. Petersburg, Russian Federation.

Senior Researcher, Department of General Pathology and Pathophysiology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Чередова К.В. – лаборант-исследователь отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Cheredova K.V. – lab technician, Department of Pathology and Pathophysiology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Мильман Б.Л. – д.х.н, зав. лабораторией биомедицинской и фармацевтической масс-спектрометрии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Milman B.L. – ScD, Head of Laboratory for Mass Spectrometry, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Шамова О.В. – д.б.н., доцент, зав. отделом общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ
CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

Shamova O.V. – PhD, ScD, Head of the Department of General Pathology and Pathophysiology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Исакова-Сивак И.Н. – д.б.н., зав. лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева, ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Isakova-Sivak I.N. – PhD, ScD, Head of the Laboratory of immunology and prevention of viral diseases, Department of Virology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Дешева Ю.А. – д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Desheva Y.A. – MD, PhD, ScD, Senior Researcher, Department of Virology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ

Индукция перекрестно-реактивных антител у мышей, иммунизированных консервативными линейными В-клеточными эпитопами нейраминидазы вируса гриппа А

Induction of cross-reactive antibodies in mice immunized with conserved linear B-cell epitopes of influenza A virus neuraminidase

Авторы:

Сычев И.А.¹ – младший научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Sychev I.A.^a – MD, Junior Researcher, Department of Virology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Копейкин П.М.¹ – младший научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Kopeikin P.M.^a – Junior Researcher, Department of General Pathology and Pathophysiology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Цветкова Е.В.^{1,2} – к.б.н., доцент, кафедра биохимии, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия.

Старший научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Tsvetkova E.V.^{a,b} – PhD, Associate Professor, The Department of biochemistry, FSBEI HE “Saint-Petersburg State University”, St. Petersburg, Russian Federation.

Senior Researcher, Department of General Pathology and Pathophysiology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ
CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

Чередова К.В.¹ – лаборант-исследователь отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Cheredova K.V.^a – lab technician, Department of Pathology and Pathophysiology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Мильман Б.Л.¹ – д.х.н, зав. лабораторией биомедицинской и фармацевтической масс-спектрометрии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Milman B.L.^a – ScD, Head of Laboratory for Mass Spectrometry, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Шамова О.В.¹ – д.б.н., доцент, зав. отделом общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Shamova O.V.^a – PhD, ScD, Head of the Department of General Pathology and Pathophysiology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Исакова-Сивак И.Н.¹ – д.б.н., зав. лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева, ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Isakova-Sivak I.N.^a – PhD, ScD, Head of the Laboratory of immunology and prevention of viral diseases, Department of Virology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

Дешева Ю.А.¹ – д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ
CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

Desheva Y.A.^a – MD, PhD, ScD, Senior Researcher, Department of Virology, FSBSI “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation.

1. Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины».
2. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет».
 - a. Federal State Budgetary Scientific Institution “Institute of Experimental Medicine”.
 - b. Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Saint-Petersburg State University”.

Сокращённое название:

Консервативные эпитопы нейраминидазы
Conserved influenza NA epitopes

Ключевые слова: вирус гриппа А, иммунный ответ, универсальная гриппозная вакцина, гетеросубтипический иммунный ответ, антинейраминидазные антитела, линейные В-клеточные эпитопы.

Key words: influenza A virus, immune response, universal influenza vaccine, heterosubtypic immune response, antineuraminidase antibodies, linear B-cell epitopes.

Адрес для корреспонденции:

Сычев Иван Александрович

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ
CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт
экспериментальной медицины»

197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12.

Тел.: +7 (904) 638-04-18.

E-mail: sychev.ia@iemspb.ru

Address for correspondence:

Sychev Ivan

Federal State Budgetary Scientific Institution “Institute of Experimental Medicine”

197376, Russian Federation, St. Petersburg, Pavlov str., 12.

Phone: +7 (904) 638-04-18.

E-mail:

sychev.ia@iemspb.ru

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

| Порядк овый номер | Название на русском, ФИО авторов | Название на английском, ФИО авторов | DOI/URL |
|-------------------------|---|--|---------|
| 1. | Дешева Ю.А., Руденко Л.Г., Александрова Г.И. Штамм вируса гриппа A/17/mallard/Нидерланды/00/95(H7N 3) для производства живой и производства инактивированной гриппозных вакцин. Патент на изобретение 2012108866 Российская Федерация, опубликовано: 20.09.2013, Бюллетень изобретений. № 26, 2014. | Desheva Y.A., Rudenko L.G., Alexandrova G.I. The strain of influenza virus A/17 /mallard/Netherlands/00/95 (H7N3) for the production of live and production of inactivated influenza vaccines. Patent for invention 2012108866 Russian Federation, published: 09.20.2013, Bulletin of inventions. No. 26, 2014. | - |
| 2. | Дешева Ю.А., Смолоногина Т.С., Руденко Л.Г. Реассортантный штамм вируса гриппа RN2/57-Human A(H7N2) для определения антител к нейраминидазе при гриппозной инфекции и вакцинации. Патент на изобретение 2464312 Российская Федерация, опубликовано: 20.10.2012, Бюллетень изобретений. № 29, 2012. | Desheva Y.A., Smolonogina T.S., Rudenko L.G. Reassortant strain of influenza virus RN2/57- Human A(H7N2) for the determination of antibodies to neuraminidase during of influenza infection and after vaccination. Patent for invention 2464312 Russian Federation, published: 10.20.2012, Bulletin of inventions. No. 29, 2012. | - |

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ

CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

| | | | |
|----|---|---|---|
| | | | |
| 3. | <p>Дешева Ю.А., Смолоногина Т.С., Руденко Л.Г., Киселева И.В., Ларионова Н.В. Реассортантный штамм вируса гриппа RN 1/09-Swine A(H7N1) для определения антител к нейраминидазе при гриппозной инфекции и вакцинации. Патент на изобретение 2428476 Российская Федерация, опубликовано: 10.09.2011, Бюллетень изобретений. № 25, 2011.</p> | <p>Desheva Y.A., Smolonogina T.S., Rudenko L.G., Kiseleva I.V., Larionova N.V. Reassortant strain of influenza virus RN1/09-Swine A(H7N1) for the determination of antibodies to neuraminidase during of influenza infection and after vaccination. Patent for invention 2428476 Russian Federation, published: 09.10.2011, Bulletin of inventions. No. 25, 2011.</p> | - |
| 4. | <p>Приказ Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12.08.1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных»</p> | <p>Order of the Ministry of Health of the USSR No. 755 of 08/12/1977 "Measures to further improve organizational forms of work using experimental animals"</p> | - |
| 5. | <p>Смолоногина Т.С., Дешева Ю.А. Реассортантный штамм вируса гриппа RN9/13-Human A(H6N9) для определения антител к нейраминидазе при гриппозной инфекции и вакцинации. Патент на изобретение 2587629 Российская</p> | <p>Smolonogina T.S., Desheva Y.A. Reassortant strain of influenza virus RN9/13-Human A(H6N9) for the determination of antibodies to neuraminidase during of influenza infection and after vaccination. Patent for invention 2587629 Russian Federation, published: 06.20.2016. Bulletin of inventions No. 17, 2016.</p> | |

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ

CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

| | | | |
|----|--|---|---|
| | Федерация, опубликовано: 20.06.2016. Бюллетень изобретений № 17, 2016. | | |
| 6. | Bao Y., Bolotov P., Dernovoy D., Kiryutin B., Zaslavsky L., Tatusova T., et al. The influenza virus resource at the National Center for Biotechnology Information. J. Virol., 2008, vol. 82, no. 2, pp. 596-601. | - | - |
| 7. | Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 1976, vol. 72, pp. 248-254. | - | - |
| 8. | Bui C., Bethmont A., Chughtai A.A., Gardner L., Sarkar S., Hassan S., et al. A systematic review of the comparative epidemiology of avian and human influenza A H5N1 and H7N9 - lessons and unanswered questions. Transbound Emerg. Dis., 2016, vol. 63, no. 6, pp. 602-620. | - | - |
| 9. | Chan W.C., White P.D. Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, 2000. | - | - |

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ

CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

| | | | |
|-----|--|---|---|
| 10. | Chen J., Liu H., Yang J., Chou K.C. Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. <i>Amino Acids</i> , 2007, vol. 33, no. 3, pp. 423-428. | - | - |
| 11. | Chen Y.Q., Wohlbold T.J., Zheng N.Y., Huang M., Huang Y., Neu K.E., et al. Influenza infection in humans induces broadly cross-reactive and protective neuraminidase-reactive antibodies. <i>Cell</i> , 2018, vol. 173, no. 2, pp. 417-429. | - | - |
| 12. | Davydov Y.I., Tonevitsky A. Prediction of linear B-cell epitopes. <i>Molecular Biology</i> , 2009, vol. 43, no. 1, pp. 150-158. | - | - |
| 13. | Desheva J.A., Lu X.H., Rekstin A.R., Rudenko L.G., Swayne D.E., Cox N.J., et al. Characterization of an influenza A H5N2 reassortant as a candidate for live-attenuated and inactivated vaccines against highly pathogenic H5N1 viruses with pandemic potential. <i>Vaccine</i> , 2006, vol. 24, no. 47-48, pp. 6859-6866. | | |

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ

CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

| | | | |
|-----|--|---|---|
| 14. | Dowdle W.R. Influenza anti-neuraminidase: the second best antibody. N. Engl. J. Med., 1972, vol. 286, no. 25, pp. 1360-1361. | - | - |
| 15. | Doyle T.M., Hashem A.M., Li C., Van Domselaar G., Larocque L., Wang J., et al. Universal anti-neuraminidase antibody inhibiting all influenza A subtypes. Antiviral research, 2013, vol. 100, no. 2, pp. 567-574. | - | - |
| 16. | Eichelberger M.C., Monto A.S. Neuraminidase, the forgotten surface antigen, emerges as an influenza vaccine target for broadened protection. The Journal of infectious diseases, 2019, vol. 219, Supplement_1, pp. 75-80. | - | - |
| 17. | Eichelberger M.C., Morens D.M., Taubenberger J.K. Neuraminidase as an influenza vaccine antigen: a low hanging fruit, ready for picking to improve vaccine effectiveness. Current opinion in immunology, 2018, vol. 53, pp. 38-44. | - | - |
| 18. | Gottlieb T., Ben-Yedidia T. Epitope-based approaches to a universal | - | - |

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ

CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

| | | | |
|-----|---|---|---|
| | influenza vaccine. Journal of autoimmunity, 2014, vol. 54, pp. 15-20. | | |
| 19. | Gravel C., Li C., Wang J., Hashem A.M., Jaentschke B., Xu K.W., et al. Qualitative and quantitative analyses of virtually all subtypes of influenza A and B viral neuraminidases using antibodies targeting the universally conserved sequences. Vaccine, 2010, vol. 28, no. 36, pp. 5774-5784. | - | - |
| 20. | Herrera-Rodriguez J., Meijerhof T., Niesters H.G., Stjernholm G., Hovden A.O., Sorensen B., et al. A novel peptide-based vaccine candidate with protective efficacy against influenza A in a mouse model. Virology, 2018, vol. 515, pp. 21-28. | - | - |
| 21. | Huang P., Xu Y., Ni H., Zhong J., Zhang X., Tan S., et al. Linear B-cell epitope mapping of neuraminidases of the 2009 A H1N1 viruses based on immunoinformatics. Vaccine, 2011, vol. 29, no. 6, pp. 1278-1282. | - | - |
| 22. | Krammer F., Fouchier R.A.M, Eichelberger M.C., Webby R.J., Shaw- | - | - |

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ

CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

| | | | |
|-----|--|---|---|
| | Saliba K., Wan H., et al. NAction! How can neuraminidase-based immunity contribute to better influenza virus vaccines? MBio, 2018, vol. 9, no. 2, e02332-17. | | |
| 23. | Larsen J.E., Lund O., Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. Immunome Res., 2006, vol. 2, no. 1., p. 2. | - | - |
| 24. | Murphy B.R., Kasel J.A., Chanock R.M. Association of serum anti-neuraminidase antibody with resistance to influenza in man. N. Engl. J. Med., 1972, vol. 286, no. 25, pp. 1329-1332. | - | - |
| 25. | Nichol K.L. Efficacy and effectiveness of influenza vaccination. Vaccine, 2008, vol. 26, Supplement 4, pp. 17-22. | | |
| 26. | Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., team U. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. Bioinformatics, 2012, vol. 28, no. 8, pp. 1166-1167. | - | - |
| 27. | Pace C.N. Evaluating contribution of hydrogen bonding and hydrophobic bonding to protein folding. Methods Enzymol., 1995, vol. 259, pp. 538-554. | - | - |

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ

CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

| | | | |
|-----|--|---|---|
| 28. | Ponomarenko J., Bui H.H., Li W., Fussedder N., Bourne P.E., Sette A., et al. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. BMC Bioinformatics, 2008, vol. 9, pp. 514. | - | - |
| 29. | Quan F.S., Kim M.C., Lee B.J., Song J.M., Compans R.W., Kang S.M. Influenza M1 VLPs containing neuraminidase induce heterosubtypic cross-protection. Virology, 2012, vol. 430, no. 2, pp. 127-135. | - | - |
| 30. | Reed L.J., Muench H.. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. American Journal of Epidemiology, 1938, vol. 27, no.3, pp. 493-497. | - | - |
| 31. | Rubinstein N.D., Mayrose I., Martz E., Pupko T. Epiptopia: a web-server for predicting B-cell epitopes. BMC Bioinformatics, 2009, vol. 10, pp. 287. | - | - |
| 32. | Saha S., Raghava G.P. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. Proteins, 2006, vol. 65, no. 1, pp.40-48. | - | - |

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ

CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

| | | | |
|-----|--|---|---|
| 33. | Schulman J.L., Khakpour M., Kilbourne E.D. Protective effects of specific immunity to viral neuraminidase on influenza virus infection of mice. <i>J. Virol.</i> , 1968, vol. 2, no. 8, pp. 778-786. | - | - |
| 34. | Soema P.C., Rosendahl Huber S.K., Willems G.J., Jacobi R., Hendriks M., Soethout E., et al. Whole-inactivated influenza virus is a potent adjuvant for influenza peptides containing CD8(+) T cell epitopes. <i>Frontiers in immunology</i> , 2018, vol. 9, pp. 525. | - | - |
| 35. | Stadlbauer D., Zhu X., McMahon M., Turner J.S, Wohlbold T.J., Schmitz A.J., et al. Broadly protective human antibodies that target the active site of influenza virus neuraminidase. <i>Science</i> , 2019, vol. 366, no. 6464, pp. 499-504. | - | - |
| 36. | Sweredoski M.J., Baldi P. COBEpro: a novel system for predicting continuous B-cell epitopes. <i>Protein Eng. Des. Sel.</i> , 2009, vol. 22, no. 3, pp. 113-120. | - | - |
| 37. | Wohlbold T.J., Krammer F. In the shadow of hemagglutinin: a growing interest in influenza viral | - | - |

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ

CONSERVED INFLUENZA NA EPITOPES

| | | | |
|-----|--|---|---|
| | neuraminidase and its role as a vaccine antigen. Viruses, 2014, vol. 6, no. 6, pp. 2465-2494. | | |
| 38. | Xiao J., Zhang L., Wang Z., Xiang W., Lu P., Zhao Y., et al. Conserved peptides enhance immune efficiency of inactive vaccines against emerging avian influenza viruses in chicken. Science China Life sciences, 2017, vol. 60, no. 12, pp. 1340-1347. | - | - |